Aus dem Medizinischen Strahleninstitut der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. med. W. Frommhold

Untersuchungen über die Wirkung von Testosteron, Rö-Strahlen und kombinierter Anwendung von Steroid und Bestrahlung auf weibliche Karzinomzellen (Stamm HeLa)

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

dem Fachbereich Klinische Medizin
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Karl-Heinz Fröhlich
aus Blankenburg/Harz

1970

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547603_0084

Aus dem Medizinischen Strahleninstitut der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. med. W. Frommhold

Untersuchungen über die Wirkung von Testosteron, Rö-Strahlen und kombinierter Anwendung von Steroid und Bestrahlung auf weibliche Karzinomzellen (Stamm HeLa)

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

dem Fachbereich Klinische Medizin
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Karl-Heinz Fröhlich
aus Blankenburg/Harz

1970

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan: Professor Dr. Dr. K. Mayer

1. Berichterstatter: Professor Dr. K. W. Peters
2. Berichterstatter: Professor Dr. W. Frommhold

FOTODRUCK PRÄZIS Barbara v. Spangenberg KG • Tübingen

Meiner Mutter in Dankbarkeit

gewidmet

Ich danke Herrn Prof. Dr. Frommhold für die freundliche Überlassung des Labors.
Ganz besonderen Dank schulde ich Herrn Prof. Dr. Peters, der mir bei der Durchführung der Arbeit stets mit seinem Rat großzügig zur Seite stand.
Nicht zuletzt möchte ich Frau Dr. Peters für ihre freundliche Mitarbeit meinen aufrichtigen Dank sagen.

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1. Material und Methode	.....	1
2. Ergebnisse	.....	5
A. Propylenglykol	.....	5
B. Hormon und Bestrahlung	.....	8
a) Testosteron (Schering)	.....	8
b) Testosteron (Ciba)	.....	10
3. Diskussion	.....	13
4. Zusammenfassung	.....	20
5. Literaturverzeichnis	.....	22

Material und Methode

Für die Versuche wurden in vitro gezüchtete Karzinomzellen vom "Stamm HeLa" verwendet. Sie wurden 1951 von GEY und Mitarbeitern (18) bei Untersuchungen zur Ermittlung des Wachstumspotentials normaler und karzinomatöser Zervixzellen isoliert. Kennzeichnend für den Zellstamm "HeLa" ist das epitheliale, in vitro hauptsächlich einzellschichtige Wachstum, daneben das Vorkommen von Riesenzellen mit einem bis vielen Zellkernen und zahlreichen Mitosen, die teils normal, teils pathologisch sind.

Die HeLa-Zellen wurden in Vierkant-Flaschen gezüchtet. Zur Anwendung kam das Medium LE, ein mit Aqua tridest angesetztes Trockenmedium, dem 10 % menschliches Serum zugesetzt wurde. Das Medium wurde auf einen p^H-Wert von 7,2 eingestellt. Um Infektionen zu verhindern, wurden dem Nährmedium die Antibiotika Penicillin (100 I.E./ml), Nebacetin (100 mg/ml) und Streptomycin (100 mg/ml) beigegeben. Für die Versuche wurden die Zellen in den Vierkantflaschen mit Trypsin behandelt, danach zweimal mit dem Medium gewaschen und dann in das Züchtungsmedium aufgenommen. Davon wurden 0,5 ml mit Pasteur-Pipetten auf Deckgläser in Rollertubes aufgebracht. Nach 4 Stunden hatten sich genügend Zellen abgesetzt und hafteten an den Deckgläsern. Nun wurde das Medium auf 2 ml ergänzt und die Rollertubes in den Roller gebracht.

Der Roller drehte sich mit 6 bis 8 Umdrehungen pro Stunde. Die Kulturen wurden bei einer Bruttemperatur von 37°C gehalten. In einer Vorversuchsreihe wurde die Wirkung von Propylenglykol, welches als Lösungsvermittler für Testosteron (Schering) dient, in vier verschiedenen Konzentrationen getestet.

Der Zusatz der Hormone erfolgte 24 Stunden nach Ansetzen der Kulturen. Die HeLa-Zellen wurden mit Testosteron der Firmen Ciba bzw. Schering als gegengeschlechtliches Hormon behandelt.

Als Testosterone kamen Testosteronhemichinolat (Ciba) und Testoviron-T (Schering) zur Anwendung. Für Testosteronhemichinolat wurde Natriumkarbonat und für Testoviron-T Propylenglykol als Lösungsvermittler benutzt. Die Hormone wurden in drei Konzentrationen getestet. Für jede Konzentration wurden 5 Kulturen angesetzt.x)

Als Kontrolle wurden bei jeder Versuchsreihe 5 unbehandelte Zellkulturen mitgeführt.

In weiteren Versuchen wurden die Zellen einmal allein einer Röntgenbestrahlung unterworfen, das andere Mal zusätzlich mit Testosteron behandelt. Die Strahlendosis betrug 200 R Rö (18 mA, 0,5 mm Cu, 200 kV, FHA 40 cm). Das Hormon wurde in der II. der geprüften Konzentrationen verwendet.

Damit gliedert sich der Versuch folgendermaßen auf:

5 Kontrollen
5 Kulturen + Propylenglykol verschiedener Konzentrationen
5 Kulturen + Testosteron Ciba (II. Konz.)
5 Kulturen + Testosteron Schering (II. Konz.)
5 Kulturen + 200 R Rö
5 Kulturen + Testosteron Ciba (II. Konz.) + 200 R Rö
5 Kulturen + Testosteron Schering (II. Konz.) + 200 R Rö

Die Hormonkonzentration I bestand in einer Verdünnung von 1/200 000, die Konzentration II in einer Verdünnung von 1/2 000 000 und die Konzentration III in einer Verdünnung von 1/20 000 000.

Die verwendete Dosis von 1/2 000 000 hatte keine toxischen Nebenwirkungen, die jedoch bei einer Konzentration von 1/200 000 beobachtet wurden.

---

x) s. Med. Dissertation Schaarschmidt

Die Zellen wurden 24 Stunden nach Hormonzugabe bzw. Röntgenbestrahlung für 15 Minuten nach BOUIN-ALLEN fixiert und nach WEIGERT gefärbt. Dazu wurden zwei Lösungen benötigt:

Lösung a: 1 g Hämatoxylin in 100 cm^3 Aqu. dest.
Lösung b: 4 cm^3 Liqu. ferri sesquichlorati,
1 cm^3 offizinelle HCl, 95 cm^3 Aqu. dest.

Unmittelbar vor Gebrauch wurden die Lösungen a und b zu gleichen Teilen gemischt.

Zur Färbung wurde das horizontal liegende Präparat, das sich vorher in destilliertem Wasser befand, mit einigen Tropfen Farblösung bedeckt. Nach 1 bis 2 Minuten Einwirkung wurde die Lösung unter fließendem Wasser ausgewaschen. Nach aufsteigender Alkoholreihe erfolgte die Überführung in Xylol und die Einbettung in Eukitt.

Die Präparate wurden mit dem Leitz-Ortholux (Ölimmersion A:1,3 Okular 10^x) ausgezählt. Je 1 000 Zellen wurden aus jeder Kultur ausgewertet. Dann wurden die Mittelwerte der fünf zu einer Serie gehörenden Kulturen ermittelt.

Bei der mikroskopischen Auswertung wurden die Blickfelder in gleichen Abständen über das ganze Präparat verteilt. Berücksichtigt wurden nur diejenigen Zellen, die eine einwandfreie Deutung ermöglichten, weil bei vielen bestrahlten und mit Hormonen behandelten Zellen durch Schädigung eine genaue Beurteilung schwierig ist.

Die Auswertung wurde nach folgenden Gesichtspunkten vorgenommen:

1. Mitosehäufigkeit
2. Pathologische Mitosen
3. Cytolysen und Pyknosen

Die Mitosehäufigkeit - Ausdruck der Reproduktionsfähigkeit

der Zelle - umfaßt die Gesamtheit aller Teilungsphasen.

Die einzelnen Stadien wie Prophase, Metaphase, Anaphase und Telophase wurden außerdem gesondert registriert. Die bei den Meta-, Ana- und Telophasen auftretenden pathologischen Veränderungen wurden ebenfalls erfaßt.

Cytolysen und Pyknosen sind Ausdruck von Zellschädigung in der Interphase oder Spätfolgen von pathologisch abgelaufenen Zellteilungen.

Um die Unterschiede zwischen den einzelnen zu vergleichenden Mittelwerten beurteilen zu können, wurde die t-Verteilung nach FISHER (15) verwendet für Sicherungsgrenzen P von 5 %, 2 %, 1 % und die von KOLLER (24) ermittelte Grenze für eine Überschreitungswahrscheinlichkeit von 0,27 %. Die Differenz von zwei zu vergleichenden Mittelwerten M_D wurde dabei mit dem Vielfachen der Differenz der Streuung σ_D in Verhältnis gesetzt.

$$\sigma_D = \sqrt{\frac{\sigma_1^2}{n_1} + \frac{\sigma_2^2}{n_2}}$$

Das Vielfache von σ_D ergibt sich als:

$$t = \frac{M_1 - M_2}{\sigma_D}$$

Danach gilt ein Unterschied zwischen zwei Mittelwerten als signifikant, wenn die Differenz der Mittelwerte größer als die Differenz der Streuung ist, multipliziert mit dem t-Wert:

$$M_D > \sigma_D \times t$$

Die Freiheitsgrade (nf) sind in den vorliegenden Fällen um 2 kleiner als die Gesamtzahl.

$$n = n_1 + n_2 \text{ der Beobachtungen.}$$

Als Beispiel seien in der folgenden Tabelle einige t-Werte der verwendeten Sicherungsgrenze P angeführt.

Zahl der Freiheitsgrade	t-Werte bei Sicherungsgrenzen P von			
n_f	5 %	2 %	1 %	0,27 %
8	2,3	2,9	3,4	4,3

Ergebnisse

A. Propylenglykol

Propylenglykol kam als Lösungsvermittler für das Testosteron der Firma Schering in Frage. Um zu klären, ob und in welchem Ausmaß der Alkohol selber Einfluß auf die Zellen hat, wurde er in vier verschiedenen Konzentrationen getestet:

Konzentration A: 1 : 10
Konzentration B: 1 : 50
Konzentration C: 1 : 100
Konzentration D: 1 : 1 000

Untersucht wurden Mitosehäufigkeit, pathologische Mitosen, Cytolysen und Pyknosen der mit diesen Konzentrationen behandelten Zellen.

Wie aus Tabelle 1 zu ersehen ist, konnten Mitosehäufigkeit und pathologische Mitosen bei Konzentration A nicht erfaßt werden, da die Zellen unter dem Einfluß von Propylenglykol während der Mitose denaturiert wurden. Lediglich Cytolysen und Pyknosen stellten sich deutlich dar.

Tabelle 1

Prozentuale Verteilung

	Mitose-häufigkeit	Patholog. Mitosen	Cytolysen und Pyknosen
Kontrollen	67,2 ± 38,7	31,5 ± 4,5	5,4 ± 0,9
Konz. A:	---	---	224 ± 8,97
Konz. B:	144,0 ± 49	67,8 ± 6,8	13,6 ± 1,5
Konz. C:	77,5 ± 8,0	33,4 ± 4,3	9,4 ± 3,4
Konz. D:	82,1 ± 9,9	27,3 ± 9,45	7,0 ± 1,1

Tabelle 2

Statistischer Vergleich der Mitosehäufigkeit, der pathologischen Mitosen und der Cytolysen und Pyknosen

M_1 - M_2	M_D	σ_D	nf	P	t	$t \cdot \sigma_D$	$M_D \lessgtr \sigma_D \cdot t$	Signifikanz
Mitosehäufigkeit								
B-Kontrolle	76,8	28	8	5%	2,3	65,0	>	+
C-Kontrollen	10,3	17,7	8	5%	2,3	40,8	<	-
D-Kontrollen	14,9	17,8	8	5%	2,3	41,0	<	-
Pathologische Mitosen								
B-Kontrollen	36,3	3,65	8	0,27%	4,3	15,7	>	+
C-Kontrollen	1,9	2,78	8	5%	2,3	6,4	<	-
D-Kontrollen	4,2	4,68	8	5%	2,3	10,7	<	-
Cytolysen und Pyknosen								
A-Kontrollen	219,6	16,2	8	0,27%	4,3	69,7	>	+
B-Kontrollen	8,2	0,78	8	0,27%	4,3	3,35	>	+
C-Kontrollen	4,0	1,57	8	5%	2,3	3,6	>	+
D-Kontrollen	1,6	0,57	8	5%	2,3	1,72	<	-

Die Mitosehäufigkeit stieg unter Propylenglykol-Einfluß bei den Konzentrationen B, C und D an. Es gab aber nur unter dem Einfluß von Konzentration B statistisch signifikante Werte, mit einer Wahrscheinlichkeit von P = 0,27 %.

Bei den pathologischen Mitosen zeigte sich lediglich unter Einfluß von Propylenglykol-B eine signifikante Zunahme. Die Zahl der Cytolysen und Pyknosen erhöhte sich nach Propylenglykol-Einfluß besonders bei Verwendung von Konzentration A, aber auch nach den Konzentrationen B und C statistisch signifikant. Eine leichte Erhöhung mit Konzentration D war nicht zu sichern.

Da die mitotischen und zellulären Veränderungen unter Einfluß von Konzentration D äußerst geringfügig waren, wurde sie als Lösungsvermittler für die Hormone gewählt.

B. Hormon und Bestrahlung

a) Testosteron (Schering)

Der folgende Versuch gliedert sich in drei Abschnitte:

Bestrahlung der Kulturen mit 200 R Rö,
Behandlung der Kulturen mit Testosteron der Verdünnung 1 : 2 000 000,
Bestrahlung und Testosteron-Behandlung in kombinierter Anwendung.

Tabelle 3

Prozentuale Verteilung

	Mitose-häufigkeit	Patholog. Mitosen	Cytolysen und Pyknosen
Kontrollen	42,6 ± 4,6	20,9 ± 6,0	21,6 ± 1,8
Bestrahlung	21,6 ± 5,0	25,8 ± 10,4	47,6 ± 8,9
Testosteron (Schering)	44,8 ± 5,66	36,6 ± 6,9	27,4 ± 7,3
Bestrahlung u. Testosteron (Schering)	12,0 ± 2,45	20,6 ± 16,3	83,9 ± 24,9

Tabelle 4

Statistischer Vergleich der Mitosehäufigkeit, der pathologischen Mitosen und der Cytolysen und Pyknosen

M_1 - M_2	M_D	σ_D	nf	P	t	$t \cdot \sigma_D$	$M_D \lessgtr \sigma_{D \cdot t}$	Signifikanz
Mitosehäufigkeit								
Kontrolle-Bestrahlung	21,0	3,4	8	0,27%	4,3	13,1	>	+
Kontrolle-Bestrahlung u. Testosteron	30,6	2,34	8	0,27%	4,3	10,3	>	+
Testosteron-Kontrolle	2,2	3,28	8	5%	2,3	7,5	<	-
Pathologische Mitosen								
Bestrahlung-Kontrolle	5,0	5,36	8	5%	2,3	12,3	>	-
Testosteron-Kontrolle	15,7	4,08	8	1%	3,4	13,9	>	+
Kontrolle-Testosteron u. Bestrahlung	0,3	7,76	8	5%	2,3	17,8	<	-
Cytolysen und Pyknosen								
Bestrahlung-Kontrolle	26,0	4,08	8	0,27%	4,3	17,6	>	+
Bestrahlung u. Testosteron-Kontrolle	62,3	11,1	8	0,27%	4,3	48,0	>	+
Testosteron-Kontrolle	5,8	3,3	8	5%	2,3	7,7	<	-

Wie Tabelle 3 zeigt, bleibt die Mitosehäufigkeit nach alleiniger Hormonbehandlung gegenüber den Kontrollen unverändert, dagegen resultiert nach Bestrahlung eine deutliche Reduktion, welche durch kombinierte Behandlung mit Testosteron noch verstärkt wird.

Die pathologischen Mitosen erfahren nach der Behandlung mit Testosteron eine Zunahme, Bestrahlung mit und ohne Hormonbehandlung lassen keine Wirkung erkennen.

Cytolysen und Pyknosen weisen in den mit Testosteron behandelten Kulturen keine signifikanten Differenzen gegenüber den Kontrollen auf. Ihr Anstieg nach Bestrahlung ist statistisch signifikant und läßt sich durch zusätzliche Hormonbehandlung noch erhöhen mit einer statistischen Wahrscheinlichkeit von P = 0,27 %.

b) Testosteron (Ciba)

Zur Verwendung gelangte das Testosteron der Firma Ciba. Die Versuchsanordnung glich der der Untersuchungen mit Testosteron Schering (s. S. 8).

Tabelle 5

Testosteron (Ciba) und Bestrahlung

	Mitose-häufigkeit	Patholog. Mitosen	Cytolysen und Pyknosen
Kontrollen	63,0 ± 8,6	25,1 ± 3,4	15,4 ± 2,5
Bestrahlung	45,0 ± 4.4	47,2 ± 19,5	26,4 ± 11,6
Testosteron	53,0 ± 7,1	37,2 ± 7,45	22,6 ± 7,1
Bestrahlung und Testosteron	51,8 ± 7,2	56,2 ± 6,7	39,2 ± 3,27

Tabelle 6

Statistischer Vergleich der Mitosehäufigkeit, der pathologischen Mitosen und der Cytolysen und Pyknosen

M_1 - M_2	M_D	σ_D	nf	P	t	$t \cdot \sigma_D$	$M_D \lessgtr \sigma_D \cdot t$	Signifikanz
Mitosehäufigkeit								
Kontrollen-Bestrahlung	8,0	7,5	8	5%	2,3	17,5	>	+
Kontrollen-Bestrahlung u.Testosteron	11,2	5,0	8	5%	2,3	11,5	<	-
Kontrollen-Testosteron	10,0	4,9	8	5%	2,3	11,4	<	-
Patholog. Mitosen								
Bestrahlung-Kontrollen	22,1	6,7	8	2%	2,9	19,3	>	+
Testosteron-Kontrollen	12,1	3,66	8	2%	2,9	10,6	>	+
Bestrahlung u. Testosteron-Kontrollen	31,1	3,4	8	0,27%	4,3	14,6	>	+
Cytolysen u. Pyknosen								
Bestrahlung-Kontrollen	11,0	5,3	8	5%	2,3	12,2	<	-
Testosteron-Kontrollen	7,2	3,35	8	5%	2,3	7,7	<	-
Bestrahlung u. Testosteron-Kontrollen	18,8	1,84	8	0,27%	4,3	7,9	>	+

Wie Tabelle 5 zeigt, nahm die Mitosehäufigkeit gegenüber den Kontrollen nach alleiniger Testosteron-Behandlung, Kombination von Bestrahlung und Testosteron-Behandlung sowie alleiniger Bestrahlung ab. Statistisch zu sichern waren nur die Werte der letzten Gruppe mit P = 5 %.

Die pathologischen Mitosen vermehrten sich bei allen drei Behandlungsarten. Die stärkste Zunahme zeichnet die kombinierte Behandlung mit einer Signifikanz von P = 0,27 % gegenüber einer Signifikanz von P = 2 % nach alleiniger Testosteron-Behandlung wie alleiniger Bestrahlung.

Ebenso ist die Zunahme an Cytolysen und Pyknosen, wie sie für alle drei Behandlungsarten typisch ist, bei der kombinierten Behandlung am größten und läßt sich nur hier mit P = 0,27 % statistisch sichern.

Die Ergebnisse beider Versuchsgruppen lassen sich wie folgt zusammenstellen:

Alleinige Bestrahlung mit 200 R Rö führt in beiden Versuchen zu einer signifikanten Abnahme der Mitosehäufigkeit. Die pathologischen Mitosen zeigen im ersten Versuch die Tendenz einer Erhöhung. Im zweiten Versuch ist die Erhöhung statistisch signifikant. Cytolysen und Pyknosen sind im ersten Versuch statistisch signifikant erhöht. Im zweiten Versuch liegt nur eine Tendenz im gleichen Sinne vor.

Die Testosterone beider Firmen beeinflussen in dem untersuchten Konzentrationsbereich die Mitosehäufigkeit nur unwesentlich, führen aber beide zu einer statistisch gesicherten Zunahme der pathologischen Mitosen. Cytolysen und Pyknosen zeigen nach Behandlung mit beiden Hormonen nur die Tendenz zu einer Erhöhung.

Die Koppelung von Bestrahlung und Testosteron-Behandlung zeigt bei beiden Hormonen eine Reduzierung der Mitosehäufigkeit, die nur bei Testosteron Schering statistisch signifi-

kant ist. Die Zahl der pathologischen Mitosen vermehrt sich bis zu einer statistischen Signifikanz nur nach der Kombination mit Testosteron Ciba. Cytolysen und Pyknosen erfahren nach der kombinierten Behandlung mit beiden Hormonen eine deutlich statistisch gesicherte Vermehrung.

Diskussion

Die Gewebekultur ist für die unmittelbare Betrachtung der Zellreaktion besonders gut geeignet, bleiben doch in ihr die normalen Funktionen der Zelle uneingeschränkt erhalten, insbesondere die Reproduktions- und Proliferationsfähigkeit.

In vitro vollzieht sich Wachstum und Vermehrung unter vereinfachten Lebensbedingungen, da die komplexen Regulationsvorgänge des Gesamtorganismus über nervöse, vaskuläre und hormonale Faktoren ausgeschaltet sind und somit die Beobachtung des Zellzyklus erleichtert wird. Die Mitose stellt eine der Lebensäußerungen der intakten Zellen dar, deren regelrechter Ablauf den Bestand eines Organs oder des gesamten Organismus sichert. Eine Störung des Zellzyklus muß zwangsläufig zu sichtbaren Veränderungen führen; sie kann durch verschiedene Stoffe ausgelöst werden. Die vorliegenden Untersuchungen dienten der Beantwortung der Frage, welche Wirkung Bestrahlung, männliches Hormon und besonders die Kombination von beiden auf Portiokarzinomzellen (Stamm HeLa) haben. Außerdem versuchten wir in einer weiteren Testreihe zu ermitteln, bei welcher Alkoholkonzentration eine Schädigung der Zellen eintritt, da Propylenglykol als Lösungsvermittler für Testosteron (Schering) verwendet wurde.

Die Ergebnisse des Alkoholversuchs zeigen, daß ein Einfluß auf die Teilungsvorgänge der Zellen bei einer Konzentration von 1 : 1 000 nicht mehr statistisch zu sichern ist, während bei einem Lösungsverhältnis von 1 : 100 Cytolysen und Pyknosen eine Zunahme erfahren.

Die Konzentration 1 : 50 bewirkt erhöhte Mitosehäufigkeit, Vermehrung der pathologischen Teilungsphasen und eine gesteigerte Zahl an Cytolysen und Pyknosen. Bei einer Konzentration von 1 : 10 war lediglich eine sehr starke Zunahme der Cytolysen und Pyknosen zu sichern, da die mitotischen Zellen völlig denaturiert waren.

Das vermehrte Auftreten von pathologischen Mitosen, Cytolysen und Pyknosen bedeutet eine Schädigung der Zelle durch die einzelnen Alkoholkonzentrationen. In diesem Zusammenhang sind die Untersuchungen anderer Autoren von Interesse.

Bei Versuchen an Meerschweinchenmilzkulturen wurde einmal Äthylalkohol, zum anderen Propylalkohol verwendet (25). Danach verhindert 1 %iger Äthylalkohol das Wachstum der Fibroblasten fast vollständig, um bei einem Lösungsverhältnis von 0,1 % und 0,001 % das Wachstum anzuregen. Propylalkohol tötete 1 %ig die Kulturen ab und wirkte bei einer Konzentration von 0,1 % noch wachstumshemmend. Diesen Resultaten stehen unsere Beobachtungen gegenüber, die für 0,1 %igen Propylenglykol keine Wirkung auf die Zelle erkennen lassen. Die Konzentration von 1 % hat eine signifikante Erhöhung der Cytolysen und Pyknosenzahlen zur Folge.

Man muß beim Vergleich der Ergebnisse berücksichtigen, daß es sich im ersten Fall um intaktes Milzgewebe, im zweiten aber um karzinomatöse, also krankhafte Zellen handelte. Die unterschiedliche Reaktion auf gleiche Alkoholkonzentration könnte versuchstechnischer oder genetischer und damit stoffwechselphysiologischer Natur sein.

KATZENSTEIN und KNAKE fanden bei Anwendung von 0,2 %igem Propylalkohol auf explantierte Pankreasgewebe von Hühnerembryonen eine Anregung des Epithelwachstums (23). Nach Ansicht von MÖLLENDORFF (30) scheint der Alkohol durch seine Lipoidlöslichkeit die Viskoregulation der Zelle zu beeinträchtigen. Die Regulation der Zellteilung ist ebenfalls gestört. Die Zelle kann die Störung der Oberflächenspannung infolge der

entquellenden Eigenschaft des Alkohols nicht überwinden. Bei Versuchen mit Äthylalkohol fand von MÖLLENDORFF (29), daß bis zu einer Konzentration von 1 % ein sehr geringer Einfluß auf die Teilungsphasen besteht. Ab Konzentrationen von 1,5 % entsteht ein Stopp in der späten Metaphase aufgrund der entquellenden Wirkung des Alkohols. Dieser Beobachtung zufolge wird Alkohol erst in einer Konzentration wirksam, bei welcher er seine physikalischen Einflüsse in erheblichem Maße ausübt. Diese Erkenntnisse stimmen mit unseren Versuchsergebnissen überein, die eine deutliche Schädigung im Ablauf des Zellzyklus erst von einer 2 %igen Propylenglykollösung ab erkennen lassen.

Bei einer Versuchsreihe mit Röntgenstrahlen wurde eine Dosis von 200 R Rö eingestrahlt. Die signifikante Abnahme der Mitosehäufigkeit bedeutet eine Beeinträchtigung der Vitalität der explantierten Gewebe durch die Bestrahlung. Eine Zelle, die die Fähigkeit zur Teilung verloren hat, kann 20 bis 30 Tage in vitro gehalten werden, geht dann aber zugrunde. Da die strahleninduzierte Hemmung der Zellteilung ein sehr empfindlicher und charakteristischer Effekt ist, wird dieses Phänomen an Gewebekulturen immer wieder zur Beurteilung der Strahlenwirkung herangezogen.

Die Ursache der Mitosehemmung ist bis heute noch unklar, die des Zelltodes wurde aufgrund theoretischer Berechnungen als Chromosomenschädigung angenommen. Deshalb fragt es sich, ob auch eine Unterbrechung der Mitose chromosomalen Ursprungs sein könnte. Eine These besagt, daß die Mitosehemmung das Resultat der chromosomalen Re- und Desorganisation darstellt. Sie wird dadurch gestützt, daß Konfiguration und kinetische Ordnung der Chromosomen zu den empfindlichsten Mechanismen im Rahmen des gesamten Strahlensyndroms der Zelle gehören (43). Eine andere Theorie nimmt an, daß das durch Strahlen gestörte Redoxpotential von Sulfhydrylgruppen die Ursache ist. Der Kausalfaktor wäre dann die Hemmung des Spindelaufbaues oder die Störung des Spindelmechanismus (14, 37).

Neben der verminderten Mitosehäufigkeit ist das gehäufte Auftreten von pathologischen Teilungsformen ein weiteres Kriterium für eine Strahlenschädigung. Im allgemeinen geht eine Erhöhung der abnormen Teilungsfiguren mit einer Abnahme der Mitosehäufigkeit einher, was aber nicht immer der Fall sein muß. Es läßt sich z.B. durch erhebliche Herabsetzung der Züchtungstemperaturen ein Abfall der Mitosehäufigkeit erzielen, ohne daß dabei die pathologischen Mitosen vermehrt gefunden werden. Diese pathologischen Kernteilungsfiguren bestehen aus mehrpolaren Mitosen, Chromosomenaberrationen, Chromosomenbrüchen, Brückenbildung in der Ana- und Telophase durch Verklebungen der Tochterchromosomen. In karzinomatösen Geweben, die auch unbehandelt einen gewissen Prozentsatz an pathologischen Mitosen haben, ist es möglich, daß abnorme Anaphasen bis zum Erreichen der Telophasen repariert werden. Diese Reparabilität ist nach Bestrahlung wesentlich geringer (32). Wenn diese Anomalien einen bestimmten Grad erreicht haben, muß die gestörte Mitose zwangsläufig zum Zelltod führen. Cytolysen und Pyknosen schließlich vermögen auch Aussagen über Einflüsse während der Interphase und über abgelaufene pathologische Zellteilungen zu machen.

Die Erfassung dieser Schädigungsformen ist deshalb von großem Interesse, weil selbst in mitosereichen Tumorgeweben die Zellen der Interphase in der Mehrzahl vorliegen und somit die in Teilung begriffenen Zellen von den Strahlen nur in geringer Anzahl erfaßt werden (31).

Die morphologisch faßbaren Veränderungen der bestrahlten Zellen stehen am Ende einer Reaktionsreihe, die durch Wechselwirkung von Energie mit dem Strukturelement der Zelle eingeleitet wird. Einzelne Bestandteile der Zelle unterliegen als Folge der Ionisation chemischen Veränderungen.

Betrachtet man die Ergebnisse der Versuchsreihe mit Testosteron der Konzentration II, so findet sich keine Beeinflussung der Mitosehäufigkeit durch das Sexualhormon. Es wirkt sich

also nicht auf die Lebensfähigkeit der Zelle aus. Experimente mit Epidermis der Maus in vitro, bei denen Testosteron verwendet wurde, ergaben ebenfalls keine Veränderungen der Mitosehäufigkeit (8). Die pathologischen Teilungsfiguren erfuhren nach unseren Beobachtungen eine signifikante Vermehrung durch Testosteron. Das Hormon greift folglich störend in den Ablauf der Zellteilung ein. Da aber regelwidrige Teilungen dazu führen, daß die Tochterzellen entweder gar nicht oder hinsichtlich ihres genetischen Materials nur unvollständig gebildet werden, muß die Kultur zwangsläufig zugrunde gehen.

Die Zahl der Pyknosen und Cytolysen war nach unseren Untersuchungen nicht erhöht. Das bedeutet, daß das Hormon nicht in der Interphase angreift, sondern, wie oben angeführt, nur auf die Zellen wirkt, die sich in Teilung befinden. Weiter läßt sich aus diesen Beobachtungen schließen, daß die pathologischen Zellteilungen nicht alle vollendet werden, da Cytolysen und Pyknosen auch Ausdruck für abgelaufene pathologische Mitosen sind.

STONE, der Versuche mit Sexualhormonen an verschiedenen Zellclonen von HeLa-Zellen durchführte (42), fand eine Wachstumshemmung der Karzinomzellen (Stamm HuE) unter anderem auch durch Testosteron, das demgegenüber bei einem anderen Stamm eine Stimulierung verursachte, und zwar war das Wachstum umso höher, je höher die verwendete Zellzahl war. Den Grund sieht der Autor darin, daß

1. in einer homogenen Zellpopulation mit steigender Steroidkonzentration die Konzentration an einem Hemmfaktor in oder auf den Zellen gegen die Steroide sich erhöht, und daß
2. in einer heterogenen Zellkolonie einige Zellen die Fähigkeit haben, der Wirkung der Hormone in verschiedenem Ausmaß zu trotzen.

Wird das männliche Hormon dem Medium in fester Form zugesetzt, erfolgt keine Beeinträchtigung der Zellteilung (26). In unmittelbarer Nachbarschaft zur Kultur bewirkt Testosteron eine

Zellverfettung. Die in unserem Versuch getesteten HeLa-Zellen wurden in ihrem Wachstum bei Zugabe von Testosteron gehemmt, was durch die erhöhte Anzahl an pathologischen Zellteilungen zum Ausdruck kommt. - Geschlechtshormone werden seit einigen Jahren auch in der klinischen Praxis zur Therapie besonders des Mammakarzinoms eingesetzt. Die Ergebnisse der Hormonbehandlung sind nicht einheitlich. So berichten verschiedene Autoren über einen günstigen Verlauf der Erkrankungen nach Gabe von männlichen Hormonen bei BARR-positiven Tumoren (13, 21, 27). Die 5-Jahres-Überlebensrate war bei den hormonbehandelten Patientinnen höher als bei den unbehandelten. Dem entgegen stehen die Beobachtungen von GLÄSER und REDING (19), wonach die Zahl der nach 5 Jahren Verstorbenen gleich hoch ist, unabhängig davon, ob sie vorher mit Sexualhormonen behandelt waren oder nicht.

SHAPIRO berichtet anhand von Versuchen mit Testosteron am Adenokarzinom der Mamma weiblicher Mäuse, daß das Steroid keinen Einfluß auf das Wachstum der Geschwulst besitzt (38). In der Literatur besteht jedoch Übereinstimmung über die bessere Ansprechbarkeit BARR-positiver Tumoren auf Sexualhormone gegenüber BARR-negativen. Das Fehlen der Kernkörperchen weist auf stärkere Entdifferenzierung und somit möglicherweise auf eine höhere Malignität des Gewebes hin (4). Vorhandenes Sexchromatin könnte einen geringeren Grad autonomen Wachstums andeuten, und solche Karzinome wären daher einer Beeinflussung durch das Hormonmilieu des Tumorträgers zugänglich. Das Fehlen der Kernkörperchen würde einen erhöhten Grad des autonomen Wachstums ausdrücken. Solche Karzinomzellen haben dann die Hormonabhängigkeit ihres Muttergewebes verloren (35).

Die Ergebnisse bei kombinierter Anwendung von Testosteron und Rö-Bestrahlung weichen in unseren Versuchen voneinander ab. Bei Zugabe von Testosteron der Firma Schering zeigt sich eine signifikante Verminderung der Mitosehäufigkeit, die pathologischen Mitosen sind unverändert. Die Verwendung von Testoste-

ron Ciba hat dagegen eine Beeinträchtigung der Mitosehäufigkeit nicht zur Folge, wohl aber eine wesentliche Zunahme der pathologischen Zellteilungen. Dieses gegensätzliche Verhalten läßt sich nicht erklären, da in beiden Serien gleiche Versuchsbedingungen eingehalten worden waren. Die Verringerung der Mitosehäufigkeit im ersten Fall besagt an sich hinsichtlich einer Schädigung der Zellen nicht, daß sie reversibel ist. Wichtige Aussagen über die Beeinträchtigung der Zellen machen eine gesteigerte Anzahl an pathologischen Zellteilungen und an Cytolysen und Pyknosen. Eine signifikante Vermehrung der letzteren ist bei beiden Hormonformen zu verzeichnen. Diese dürfte jedoch auf der Strahleneinwirkung beruhen, da Testosteron allein in dem verwendeten Konzentrationsbereich keinen sichtbaren Einfluß auf die Zellen in der Interphase ausübt (s. S. 17). Die pathologischen Mitosen erfahren bei Kombination von Bestrahlung und Testosteron Ciba eine wesentlich stärkere Vermehrung als durch die einzelnen Komponenten. Das läßt den Schluß zu, daß sich Hormon und Rö-Strahlen in ihrer Wirkung addieren. Die Teilungsvorgänge werden also in größerem Ausmaß gestört, als es der Fall nur nach gesonderter Anwendung von Rö-Strahlen und Sexualhormon ist. KAPLAN und BRODY konnten an Experimenten mit schwarzen Mäusen zeigen, daß Testosteron die Entwicklung des Lymphoms verhindert, wenn es zusammen mit einer Bestrahlung gegeben wird (22). Nach dem gleichen Verfahren wird in vielen Kliniken vorgegangen, um Rezidive des Mammakarzinoms nach der Operation zu vermeiden.

Abschließend kann man sagen, daß die Kombination von Röntgenbestrahlung mit Testosteron zu einer Wirkungssteigerung führt. Dieses Ergebnis spricht für verschiedene Wirkungsmechanismen beider Noxen im zellulären Bereich.

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung von männlichen Sexualhormonen, Rö-Strahlen und der Kombination von Hormon und Bestrahlung auf weibliche Karzinomzellen (Stamm HeLa) in vitro untersucht. Für jede Testserie wurden 5 Kulturen den oben genannten Behandlungsformen unterworfen, wobei zusätzlich eine unbehandelte als Kontrolle mitgeführt wurde. Von jeder Kultur wurden 1 000 Zellen ausgezählt, so daß 5 000 Zellen einer Versuchsreihe einen repräsentativen Mittelwert ergaben. Bei der Auswertung wurden Mitosehäufigkeit, pathologische Mitosen, Cytolysen und Pyknosen als Kriterien für die Wirkung von Hormon und Bestrahlung berücksichtigt.

In einem Vorversuch wurde die Wirkung von Propylenglykol auf die Gewebekultur ermittelt, da der Alkohol als Lösungsvermittler für Testosteron Schering Verwendung fand.

Ergebnisse nach
Einwirkung von Propylenglykol

Die Kulturen wurden den Alkoholkonzentrationen von 1 : 10, 1 : 50, 1 : 100, 1 : 1 000 ausgesetzt. Die variationsstatistische Auswertung ergab folgende Resultate:

1. Die Konzentration von 1 : 50 bewirkt eine signifikante Zunahme der Mitosehäufigkeit, der pathologischen Mitosen und der Cytolysen und Pyknosen.
2. Die Konzentration von 1 : 100 läßt nur die Zahl der Cytolysen und Pyknosen ansteigen.
3. Bei einem Lösungsverhältnis von 1 : 1 000 ist eine wesentliche Beeinflussung der Zellen nicht mehr vorhanden. Diese Konzentration wurde deshalb als Lösungsvermittler verwendet.
4. Die mit Abstand stärkste Vermehrung an Cytolysen und Pyknosen lag bei der Konzentration von 1 : 10 vor.

B. Testosteron (Schering) und Bestrahlung

Das Hormon wurde in einer Verdünnung von 1 : 2 000 000 angewandt. Die Strahlendosis betrug 200 R Rö.

1. Wurden die Kulturen mit Testosteron (Schering) inkubiert, blieb nach statistischer Auswertung die Mitosehäufigkeit unverändert. Die pathologischen Mitosen erfuhren eine signifikante Zunahme. Cytolysen und Pyknosen zeigten gegenüber den Kontrollen keine Abweichung.

2. Bestrahlung hatte eine statistisch gesicherte Verminderung der Mitosehäufigkeit zur Folge. Die Häufigkeit pathologischer Zellteilungen blieb unverändert. Die Zahl der Pyknosen und Cytolysen wurde erhöht gefunden.

3. Kombinierte Anwendung von Hormon und Bestrahlung bewirkte eine starke Abnahme der Mitosehäufigkeit. Die pathologischen Mitosen waren nicht vermehrt. Cytolysen und Pyknosen nahmen signifikant zu.

C. Testosteron (Ciba) und Bestrahlung

1. Die Hormongabe hatte keinen Einfluß auf die Mitosehäufigkeit. Pathologische Mitosen stellten sich vermehrt dar. Ein signifikanter Unterschied zwischen Kontrollen und Hormon behandelten Kulturen war hinsichtlich der Cytolysen und Pyknosen nicht zu verzeichnen.

2. Rö-Strahlen führten zu einer Verminderung der Mitosehäufigkeit und zu einer größeren Zahl an pathologischen Mitosen, bewirkten aber keine Zunahme der Cytolysen und Pyknosen.

3. Bei Kombination von Bestrahlung und Hormon blieb die Mitosehäufigkeit unbeeinflußt, während pathologische Mitosen, Cytolysen und Pyknosen in signifikantem Ausmaß gesteigert wurden.

Auf die Auswertung dieser Ergebnisse wurde in der Diskussion eingegangen.

Literaturverzeichnis

1. Alberti, W. und G. Pollitzer — Arch. mikr. Anat. 100, 83-109 (1923)

2. Barr, M.L. and E.G. Bertram — Nature 163, 676-677 (1949)

3. Becher, R. — Med. Klinik 18, 724 (1967)

4. Bohle, A., F. Groß, W. Mahringer und H. Trebbin — Dtsch. Med. Wschr. 89, 1215-1217 (1964)

5. Borak, J. — Strahlentherapie 44, 601-654 (1932)

6. Brody, S. and N.W. Wiquist — Endocrinology 68, 971-977 (1961)

7. Bullough, W.S. — Journal of Endocrinology 6, 340 (1950)

8. Bullough, W.S. — Vitamins and Hormones 13, 261-292 (1955)

9. Carlson, J.G. — Journal Cell. Comp. Physiol. 35, 89-101, Suppl.1 (1950)

10. Cox, S.F. — Arch. exper. Zellforsch. 11, 121-131 (1931)

11. Dirschel, W. und H.L. Krüskemper — Biochem. Zschr. 323, 520-524 (1953)

12. Edlinger, E.A. — Wien. Klin. Wschr. 72, 633-636 (1960)

13. Ehlers, P.N. — Wien. Klin. Wschr. 76, 870-871 (1964)

14. Errera, M. — The Cell Vol. I. Academic Press. N.Y.- London 1959

15. Fisher, R.A. — Statistic Methods for Res. Workers, London 1938

16. Forbes, T.R., A.J. Coulombre and J. Coulombre — Endocrinology 68, 858-861 (1961)

17. Gärtner, H. — Untersuchungen an der Gewebekultur. In: Strahlenpathologie der Zelle. Thieme-Verlag Stuttgart 1963

18. Gey, G.O., W.D. Coffmann and M.T. Kubicek — Cancer Res. 12, 264-265 (1952)

19. Gläser, A. und R. Reding — Bruns Beiträge zur Klin. Chir. 209, 326-329 (1964)

20. Hienz, H.A. — Zellkernmorphologische Geschlechtserkennung aus Theorie und Praxis. In: Einzeldarstellung in Theorie und Klinik der Medizin Dr. Alfred Hüttig-Verlag Heidelberg 1959

21. Jores, A. und H. Nowakowski — In: Praktische Endokrinologie. Thieme-Verlag Stuttgart (1964) 2. Aufl.

22. Kaplan, H.S. and M.B. Brown — Cancer Res. 12, 445-447 (1952)

23. Katzenstein, M. und E. Knake — Zschr. Krebsforsch. 33, 378-410, (1931)

24. Koller, S. — Graphische Tafeln. Darmstadt 1953

25. Krantz, H. — Zschr. Zellforsch. und mikr. Anat. 28, 709 (1938)

26. Lettré, H. und R. — Naturwissensch. 38, 70-71 (1951)

27. Lorbek, W. — Langenbecks Arch. Klin. Chir. 313, 408-410 (1965)

28. Meier-Ruge, W. und A. Kallenberger — Med. Welt 19, 871-875 (1967)

29. Möllendorff, W. — Arch. exper. Zellforsch. 19, 263-275 (1937)

30. Möllendorff, W. — Zschr. Zellforsch. 23, 706-710 (1939)

31. Parchwitz, H.K. — Strahlenwirkung auf Tumorzellen. In: Strahlenpathologie der Zelle. Thieme-Verlag Stuttgart 1963

32. Peters, K. — Fortschr. Rö-Strahlen in der Nuklearmed. 88, 50-59 (1958)

33. Peters, K. — Strahlentherapie 118, 481-502 (1962)

34. Puck, T.T. — Journal exper. Med. 103, 653-666 (1956)

35. Regele, H. — Wien. Klin. Wschr. 76, 871-873 (1964)

36. Remé, H. — Med. Welt 15, 761-766 (1966)

37. Sandritter, W. und A. Krygier — Zschr. Krebsforsch. 62, 596-608 (1959)

38. Shapiro, D.M. — Cancer Res. 12, 713-715 (1952)

39. Siebner, H. — Med. Klinik 60, 1078-1079 (1965)

40. Singer, E. und F. Hoder — Arch. Exper. Zellforsch. 8, 447-451 (1929)

41. Sisken, J.E. und R. Kinosita — Exper. Cell. Res. 22, 521-525 (1961)

42. Stone, D. and U.S. Kang — Endocrinology 71, 238-243 (1962)

43. Warren, S. — Journal Amer. Med. Ass. 133, 462-463 (1947)

44. Yamada, M.-A. — Proc. Nat. Acad. Sci. 47, 1181-1191 (1961)

Lebenslauf

Ich, Karl-Heinz Fröhlich, wurde am 8. November 1940 in Blankenburg/Harz als Sohn des 1945 gefallenen Postinspektors Ewald Fröhlich und seiner Ehefrau Hanne-Rose, geb. Rothengatter, geboren.

Im Frühjahr 1947 wurde ich in der Volksschule Cleve Krs. Halle/Westf. eingeschult. Von April 1951 bis März 1954 besuchte ich die Realschule in Halle/Westf. Im April 1954 trat ich in das Humanistische Uhland-Gymnasium in Tübingen ein. Ich bestand dort die Reifeprüfung im März 1960. Nach fast einjähriger Dienstzeit bei der Bundeswehr begann ich das Medizin-Studium im Sommer-Semester 1961 an der Universität Tübingen. Das Physikum legte ich im Sommer-Semester 1954 ab. Nach 6 Klinischen Semestern bestand ich im Februar 1969 an der Tübinger Universität das Staatsexamen.

Meine Pflichtzeit als Med.-Ass. leistete ich in der Chirurgie und in der Inneren Abteilung des Krankenhauses Halle/Westf. ab.

Nach Ableistung der Medizinalassistentenzeit erhielt ich am 27. Juli 1970 die Approbation für Ärzte.